

BAB IV

HASIL DAN PEMBAHASAN

Dalam penelitian ini, interaksi antara ligan guanidinoacetate (GAA) dengan reseptor METTL-10 dan GAMT diperoleh dengan menggunakan *webdocking PatchDock/Firedock*, iGEMDock dan di visualisasi dengan menggunakan *Discovery Studio 2017* dan LigPlot⁺. Proses *Docking* menggunakan *webserver* dihasilkan berbagai macam data berupa ΔG^0 , nilai Van der Waals (repulsif dan atraktif), *Atomic Contact Energy* (ACE), serta perhitungan Konstanta Inhibisi (K_i).

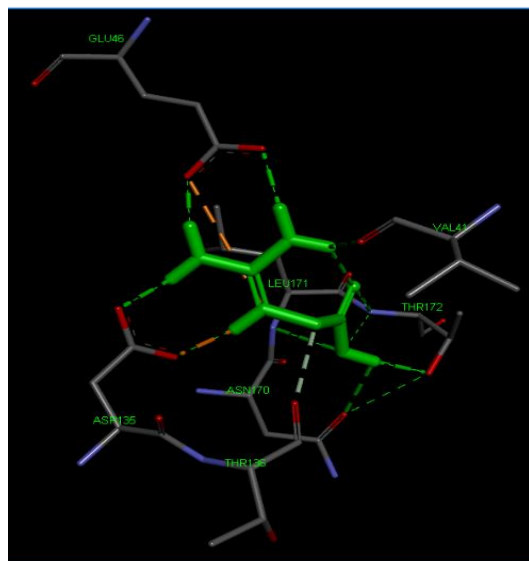
Dari hasil visualisasi menggunakan *Discovery Studio 2017*, dapat diketahui sisi aktif atau ligan interaksi dari GAMT dengan GAA maupun METTL-10 dengan GAA. Sisi aktif merupakan area atau bagian dari ligan pada suatu kompleks untuk dapat melakukan ikatan, atau interaksi ligan yang aktif atau bagian sisi dari suatu molekul yang bisa menambatkan ligan dengan reseptor. Sisi aktif tersebut dapat berupa protein – protein yang tertambat pada suatu molekul.

4.1 Interaksi GAMT dengan GAA

Pengamatan secara visual menggunakan *Discovery Studio 2017* antara GAMT dengan GAA dapat dilihat pada gambar berikut ini. Sisi aktif yang terdapat pada interaksi GAMT dengan GAA antara lain dilihat pada **Tabel 4.1**.

Tabel 4.1 Sisi aktif hasil interaksi GAMT dengan GAA

Asam Amino	
Aspartic acid 135	Leucine 171
Asparagine 170	Threonine 136
Glutamic acid 46	Threonine 172



Gambar 4.1 Interaksi antara GAMT dengan GAA

Berdasarkan hasil penambatan menggunakan *FireDock*, besarnya nilai atraktif Van der Waals sebesar -8,67 dan repulsif Van der Waals sebesar 0,58. Besarnya energi Van der Waals menunjukkan kekuatan ikatan yang terdapat pada interaksi masing – masing molekul. Semakin kecil (negatif) nilai atraktif Van der Waals, maka semakin kuat ikatan yang terjadi. Sebaliknya, semakin besar nilai repulsif Van der Waals, maka ikatan akan semakin lemah (mudah lepas) sehingga mudah untuk tergantikan dengan atom lainnya. Nilai energi kontak atom (ACE) adalah sebesar -5,29 kcal/mol, dan nilai energi total atau ΔG^0 adalah -20,79

kcal/mol serta nilai RMSD sebesar 0,0Å. *Root Mean Square Deviation* (RMSD) menunjukkan perbedaan antara koordinat ligan dari kristal dan konformasi yang di prediksi oleh program *docking*. Bila nilai RMSD yang didapatkan sebesar nol, hal itu menunjukkan solusi yang dihasilkan oleh program *docking* sudah sama dengan koordinat ligan pada struktur kristalnya. Pada penelitian sebaiknya nilai RMSD yang dihasilkan yaitu sebesar 2Å atau lebih kecil. Nilai RMSD sebesar 2Å atau lebih kecil dianggap sebagai nilai yang benar karena resolusi suatu molekul dengan menggunakan X-ray biasanya sebesar 2Å dengan tingkat presisi yang lebih baik dibandingkan resolusi pada analisis menggunakan program [34].

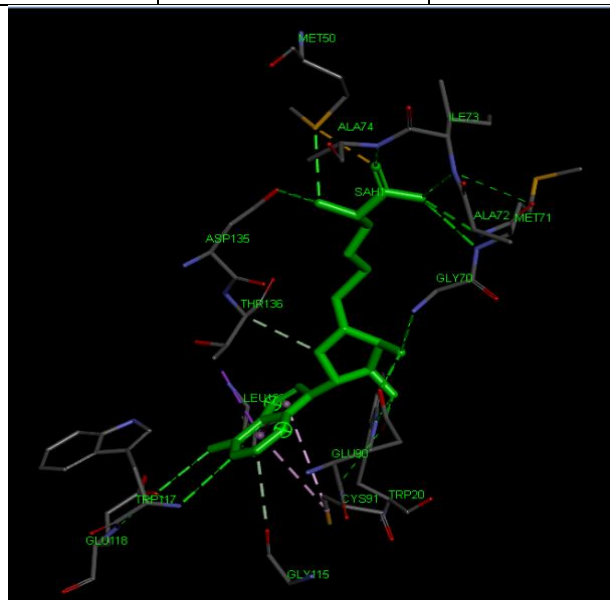
Tabel 4.2 Hasil *scoring* energi interaksi GAMT-GAA

#	Energi Total (kcal/mol)	Van der Waals (L/mol)		Atomic Contact Energy (kcal/mol)
		Atraktif	Repulsif	
1	-20,79	-8,58	0,58	-5,29
2	-22,48	-8,67	0,01	-5,98
3	-19,88	-7,62	0,28	-5,48

Untuk membandingkan data hasil yang didapatkan, dilakukan *docking* antara reseptor pada molekul dengan ligan sendiri. Dalam hal ini, ligan pada GAMT dipisahkan dengan reseptornya. Kemudian setelah dipisahkan, disimpan file (.pdb) yang baru untuk masing – masing ligan dan reseptornya, lalu di-*docking*-kan antara keduanya. Didapatkan hasil sisi aktif yang berbeda pada tabel berikut.

Tabel 4.3 Sisi aktif hasil interaksi antara GAMT dengan GAA

Asam Amino		
Alanine 72	Glycine 115	Methionine 71
Alanine 74	Glutamic acid 90	Tryptophan 20
Asparagine 135	Glutamic acid 118	Tryptophan 117
Cysteine 91	Isoleucine 73	Tryptophan 136
Cysteine 92	Leucine 139	
Glycine 70	Methionine 50	



Gambar 4.2 *Binding site* antara ligan dan reseptor pada GAMT

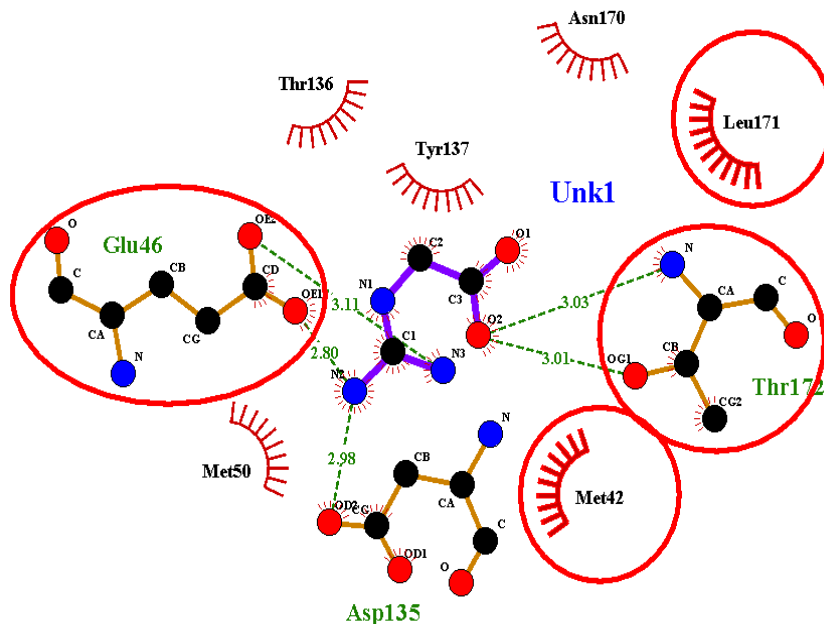
Dari hasil visualisasi antara ligan dan reseptor pada GAMT sebagai pembanding terhadap reseptor GAMT dan ligan GAA menggunakan *Discovery Studio 2017*, *binding-site* atau sisi aktif yang ada pada keduanya adalah Threonine 136 dan Aspartic Acid 135 atau sekitar 85,7% dari jumlah sisi aktif yang ada pada GAMT. Sedangkan sisi aktif lainnya yang terdapat pada kompleks GAMT-GAA yaitu Glutamic acid, Asparagine, Leucine, dan Threonine pada nomor yang berbeda.

Nilai Van der Waals berperan penting dalam menentukan bentuk komplementer dari kompleks yaitu untuk memprediksi konfigurasi *docking* sambil meminimalkan fungsi target [35]. Atraktif dan repulsif Van der Waals (L-J) akan sangat sensitif ketika atom/molekul berada pada jarak kontak Van der Waals dengan L-J optimal. Repulsif menjadi dominan ketika jarak kontak semakin kecil, sebaliknya atraktif apabila semakin meluas. Nilai atraktif Van der Waals sebesar -8,67 dan repulsif Van der Waals sebesar 0.58. Nilai L-J merupakan salah satu faktor krusial untuk mengoptimalkan energi ikatan yang didapatkan dan dapat mempengaruhi konfigurasi RMSD lebih kecil.

Nilai energi kontak atom (ACE) sebesar -5,29 kcal/mol menyebabkan konformasi ikatan semakin kuat atau semakin susah untuk saling melepaskan. Total energi atau ΔG^0 adalah -20,79 kcal/mol. Semakin kecil nilai energi bebas menunjukkan ikatan kompleks semakin kuat. Jika dihitung nilai Konstanta Inhibisi (K_i) dari molekul kompleks didapatkan sebesar 0.967. Konstanta Inhibisi menunjukkan kemampuan untuk menghambat kinerja atau interaksi enzim dengan substrat, sehingga semakin kecil nilai K_i yang didapatkan akan memungkinkan interaksi sisi aktif pada ligan dengan reseptor sudah maksimal dan ikatan yang terbentuk sudah kuat.

Gambar 4.3 Hasil visualisasi interaksi residu GAMT-GAA dengan LigPlot⁺

Jika dilihat dari sisi aktif yang didapatkan antara reseptor GAMT dengan ligannya, serta GAMT-GAA, kecocokan sisi aktif dari molekul hingga 90%. Hal ini menandakan bahwa *docking* menggunakan ligan dari



molekul itu sendiri maupun menggunakan GAA memiliki kesamaan dengan persentase yang tinggi, sehingga menunjukkan bahwa methyltransferase GAMT dengan enzim GAA akan menghasilkan kreatin.

Pengamatan visual menggunakan LigPlot⁺ pada Asparagine 135, ikatan yang terjadi adalah antara O dengan N pada asam amino yang tidak diketahui dengan jarak antar-atom sebesar 2,98Å. Pada Glutamine 46, terdapat 2 ikatan O dengan N dengan jarak masing – masing atom 2,80Å dan 3,11Å. Perbedaan jarak antaratom bisa disebabkan karena energi Van der Waals yang berbeda diantara keduanya, dimana energi pada jarak 2,80Å lebih kecil sehingga ikatan lebih kuat dan juga mampu mengikat salah satu atom O pada

Asp135. Pada Threonine 136, juga terdapat 2 ikatan dengan asam amino yang tidak diketahui yaitu O dengan O dengan jarak antaratom 3,01Å dan O dengan N dengan jarak 3,03Å. Perbedaan jarak antaratom tersebut bisa dipengaruhi karena ikatan O dengan O memiliki elektron bebas lebih banyak daripada O dengan N, sehingga ikatannya akan lebih kuat. Sedangkan asam amino Asparagine 170, Leucine 171, dan Threonine 136 tidak dapat berinteraksi mungkin disebabkan karena energi Van der Waals besar sehingga akan membentuk ikatan yang lemah.

4.2 Interaksi METTL-10 dengan GAA

Pengamatan secara visual menggunakan *Discovery Studio 2017* antara METTL-10 dengan GAA dapat dilihat pada gambar berikut ini. Sisi aktif yang terdapat pada interaksi METTL-10 dengan GAA dapat dilihat pada tabel dibawah ini.

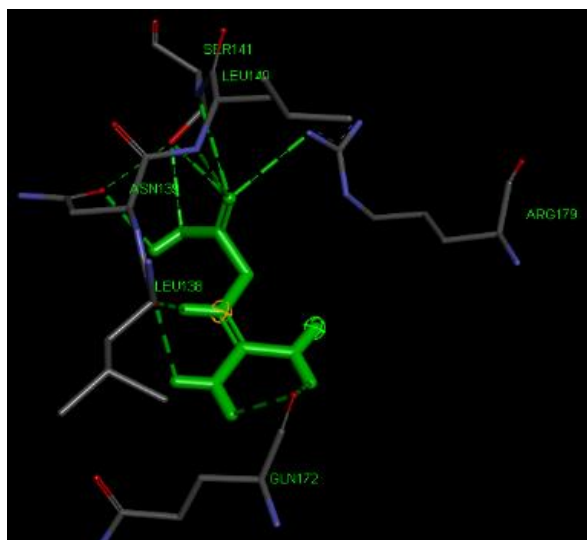
Tabel 4.4 Sisi aktif hasil interaksi METTL-10 dengan GAA

Asam amino	
Arginine 179	Leucine 138
Asparagine 139	Leucine 140
Glutamine 172	Serin 141

Berdasarkan hasil *docking* dengan *FireDock*, didapatkan beberapa data seperti nilai atraktif Van der Waals sebesar -6.58kcal/mol dan repulsif Van der Waals sebesar 1.13 kcal/mol. Nilai energi kontak atomik sebesar -3.49 kcal/mol dan nilai energi bebas sebesar -10.42 kcal/mol. Nilai RMSD sebesar 0Å serta nilai Ki yang dihasilkan adalah sebesar 0,983.

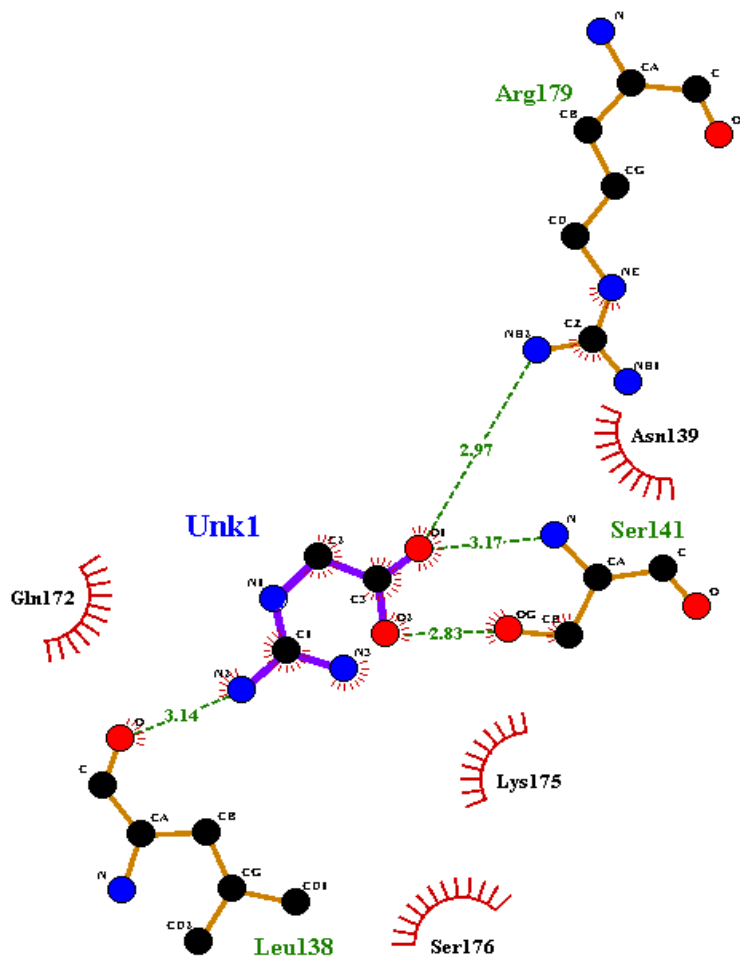
Tabel 4.5 Hasil *scoring* energi interaksi METTL-10-GAA

#	Energi Total (kcal/mol)	Van der Waals (L/mol)		Atomic Contact Energy (kcal/mol)
		Atraktif	Repulsif	
1	-10,42	-6,58	1,13	-3,49
2	-12,93	-7,11	2,80	-4,15
3	-5,19	-5,35	0,88	-1,27



Gambar 4.4 Ligan interaksi pada METTL-10

Jika dilihat dari sisi aktif antara METTL-10-GAA dengan GAMT-GAA, keduanya memiliki sisi aktif pada asparagine dan leucin. Kemiripan sisi aktif dari keduanya mencapai hampir 50%, yang menandakan bahwa GAMT bisa saja terekspresi sebagai METTL-10.



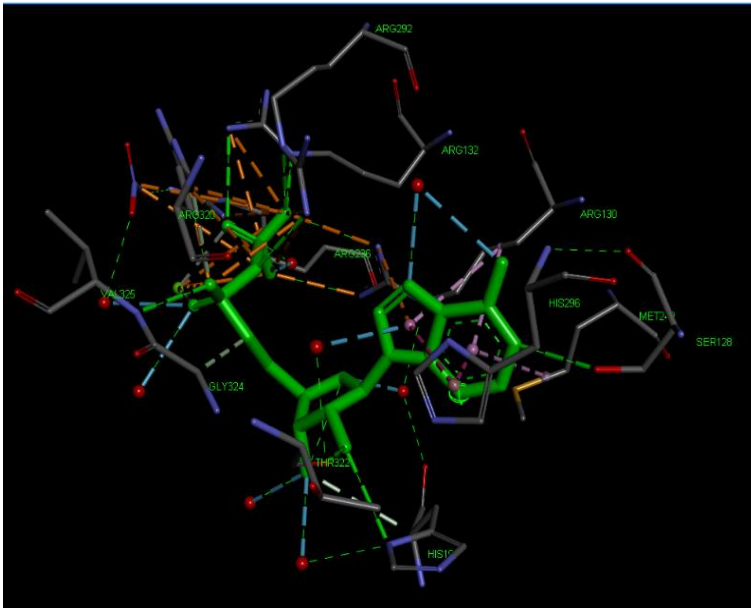
Gambar 4.5 Visualisasi interaksi residu METTL-10-GAA dengan LigPlot⁺

Pengamatan visualisasi interaksi residu METTL-10 dengan GAA terjadi interaksi Serin 141 dengan protein yang belum diketahui pada ikatan O dengan O dengan jarak antaratom 2,83 dan ikatan N dengan O dengan 3,17. Jarak antaratom O dengan O lebih kecil dibandingkan N dengan O, karena pengaruh elektron bebas ikatan O dengan O lebih banyak dan energi Van der Waals lebih rendah dibandingkan N dengan O. Pada asam amino Arginine 179, terbentuk ikatan N dengan O dengan jarak antaratom 2,97. Pada asam amino Leucine 138, terbentuk ikatan O dengan N pada jarak antaratom 3,14. Sedangkan asam amino lainnya seperti Lysine 175, Serine 176, Glutamine 172, dan Asparagine 139 tidak dapat berikatan karena pengaruh energi Van der Waals yang tinggi, sehingga akan menyebabkan ikatan lemah dan mudah lepas.

4.3 Probabilitas Interaksi Reseptor dan Ligan GAA dalam membentuk produk Kreatin

Untuk dapat mem-visualisasi kreatin sebagai hasil akhir dari metilasi guanidinoacetate methyltransferase (GAMT) dengan substrat guanidinoacetate, perlu dipersiapkan molekul kreatin dalam bentuk file (.pdb) yang diunduh dari Protein Data Bank pada alamat web <https://www.rcsb.org/>. Molekul yang dipilih adalah 3B6R dimana salah satu kristal yang memiliki kreatin kinase, lalu dioptimasi dengan menghilangkan molekul – molekul air dan molekul pengganggu lainnya. Terdapat 2 molekul besar pada

3B6R, sehingga salah satu molekulnya harus dipotong. Rantai yang dipilih adalah *chain B* yang terdapat gugus kreatin, lalu disimpan kembali dalam bentuk (.pdb), sedangkan rantai A dibuang.

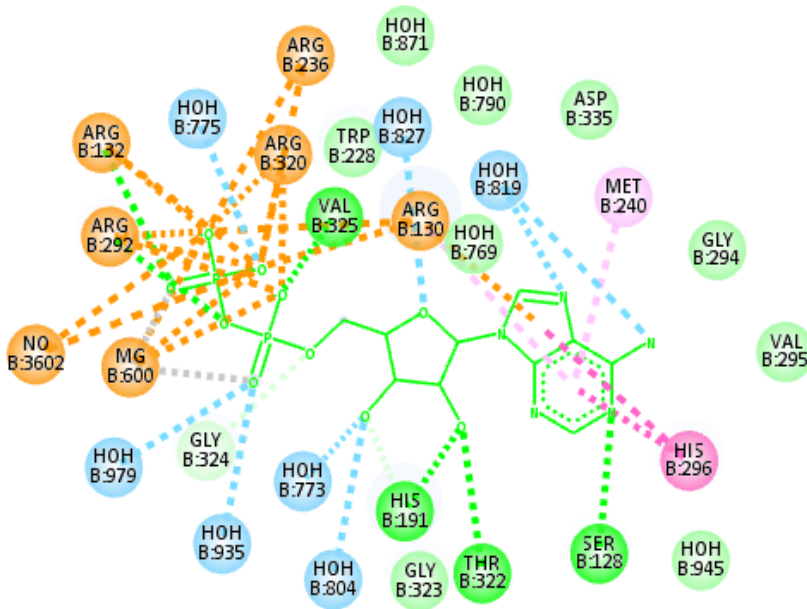


Gambar 4.6 Hasil visualisasi ligan interaksi yang terbentuk pada Kreatin

Adapun *binding-site* dari Kreatin antara lain Threonine 322; Hystidine 296; Arginine 132; Arginine 130; Arginine 292; Arginine 320; Methionine 240; Glycine 324; dan Serine 128.

Pada molekul kreatin, asam – asam amino yang paling dominan adalah arginine. Arginine merupakan asam amino unik yang terdapat pada grup guanidino yang terdiri dari 5 donor ikatan hidrogen. Apabila dihilangkan residu dari arginine akan dapat merubah bentuk

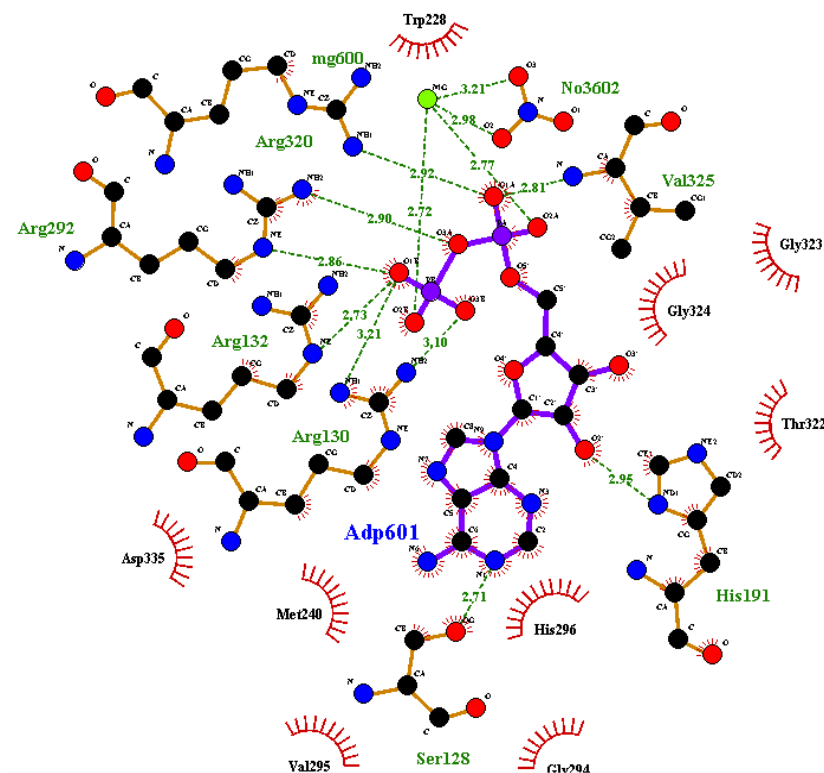
konformasi molekul [36].



Gambar 4.7 Asam amino pada

Kreatin dalam bentuk 2D

Pada **gambar 4.7** dapat diketahui bahwa ikatan yang terbentuk banyak mengandung ikatan hidrogen konvensional dan ikatan hidrogen karbon pada gambar berwarna hijau, khususnya pada Hystidine 191, Threonine 322, Serine 128 dan Valine 325. Menurut Arunan, dkk. (2011) [37], ikatan hidrogen menunjukkan interaksi antara hidrogen dengan fragmen molekul X-H dimana X lebih elektronegatif dibanding H, dan atom pada sebuah molekul terdapat tanda – tanda pembentukan ikatan. Energi Gibbs dari suatu molekul harus lebih tinggi daripada energi termal ikatan hidrogen secara eksperimen.



Gambar 4.8 Hasil visualisasi interaksi residu Creatine dengan LigPlot⁺

Pengamatan visual pada kreatin menggunakan LigPlot⁺ dimana kepala asam amino Arginine 130 berikatan dengan ekor asam amino Adp601, terbentuk 2 ikatan pada atom O dengan N dengan jarak antaratom 3,10 dan 3,20Å. Untuk Arginine 132, terdapat ikatan O dengan N pada ekor Adp601 dengan jarak antaratom 2,73Å. Untuk Arginine 292, ikatan yang terbentuk pada 2 ikatan O dengan N dengan jarak antaratom 2,86Å dan 2,92Å. Pada Arginine 320, terbentuk ikatan N dengan O pada Adp601 dengan jarak antaratom 2,92Å. Untuk Serine 128, ikatan terbentuk pada O dengan N dengan jarak antaratom 2,71Å. Sedangkan Threonine 322, Histidine 296, Methionine 240 dan Glycine 323 tidak berikatan langsung dengan residu karena kemungkinan disebabkan oleh besarnya nilai Van der Waals sehingga ikatan menjadi lemah atau mudah lepas.

Dari ligan interaksi pada GAMT dengan kreatin, sisi aktif yang memiliki kemiripan sekitar 90% asam – asam amino. Hal ini menunjukkan bahwa GAMT dapat menghasilkan kreatinin dengan metilasi substrat guanidinoacetate. Energi Gibbs yang didapatkan adalah -20.79 kcal/mol, yang menunjukkan nilai energi bebas semakin kecil namun ikatan kompleks akan semakin kuat. Nilai K_i yang didapatkan dengan perhitungan secara manual adalah 0.967. Sesuai dengan persamaan, K_i berbanding terbalik dengan nilai energi bebas Gibbs. Hal ini menunjukkan bahwa semakin kecil nilai dari energi bebas Gibbs, maka nilai K_i juga akan semakin kecil. Nilai K_i yang semakin kecil dapat menentukan bahwa ikatan antara kompleks molekul semakin kuat baik pada GAMT-GAA maupun METTL-10-GAA.

Dari ligan interaksi pada METTL-10 dan ligan interaksi pada Kreatin, terdapat sisi aktif protein yang sama pada kedua molekul yaitu serine dan arginine atau 33.3% dari seluruh jumlah protein yang ada pada kreatin. Walaupun hasil kemiripan hanya 33.3%, diduga ada kemiripan antara kedua molekul tersebut atau

diduga METTL-10 juga bisa menghasilkan kreatin. Hal ini diperkuat dengan nilai energi bebas Gibbs dengan nilai negatif menunjukkan kompleks berjalan spontan sehingga ikatannya semakin kuat, yaitu -10,42 kcal/mol. Nilai K_i yang didapatkan dengan perhitungan secara manual ialah sebesar 0,983 menunjukkan semakin kecil nilai inhibisi ikatan kompleks akan semakin kuat. Tabel data energi masing – masing kompleks dapat dilihat pada **tabel 4.6**

Tabel 4.6 Tabel data energi dan konstanta inhibisi dari reseptor

	ΔG^0 (kcal/mol)	K_i
GAMT	-20,79	0,967
METTL10	-10,42	0,983

Dari nilai energi bebas Gibbs dan K_i yang didapatkan bahwa semakin kecil (negatif) nilai dari energi Gibbs, maka pembentukan kreatin akan semakin besar. Energi Gibbs pada GAMT sebesar -20,79 kcal/mol menunjukkan bahwa GAMT akan menghasilkan kreatin. Energi Gibbs sebesar -10,42 kcal/mol pada METTL-10 juga akan menghasilkan kreatin walaupun jumlah yang dihasilkan tidak sebesar pada GAMT. Hal ini bisa dipengaruhi karena nilai K_i dari METTL-10 lebih besar daripada GAMT sehingga akan lebih menghambat reaksi untuk menghasilkan produk kreatin. Tetapi nilai K_i antara GAMT dan METTL-10 yang tidak berbeda jauh menunjukan sifat keduanya yang relatif sama dan didukung dengan jumlah sisi aktif keduanya juga memiliki kesamaan.

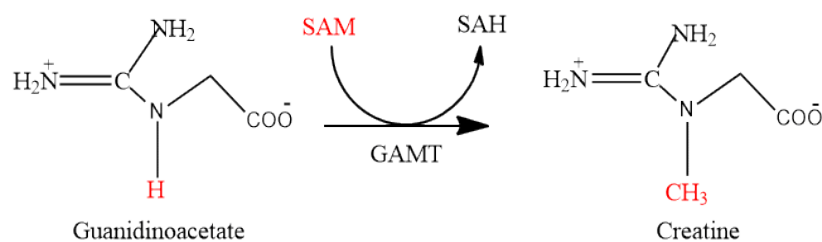
Berdasarkan hasil *docking* menggunakan iGEMDock, didapatkan data seperti ditunjukkan pada **tabel 4.7**

Tabel 4.7 Tabel data energi GAMT dan METTL-10 dengan ligannya

Kompleks	Total Energy (ΔG^0) (kcal/mol)	$\Delta G_{\text{reaksi}} = \Delta G_{\text{produk}} - \Delta G_{\text{reaktan}}$ (kcal/mol)
GAA SAM GAMT	-167.6684	-0,4204
SAH KREATIN GAMT	-168.0888	
GAA SAM METTL-10	-164.8043	-4,9247
GAA SAM METTL-10	-169.729	

Nilai energi total (ΔG^0) dari GAMT-GAA-SAM adalah sebesar 167.6684 kcal/mol dan GAMT-SAH-Kreatin sebesar -168.0888 kcal/mol, sehingga didapatkan ΔG_{reaksi} sebesar -0,4204 kcal/mol. Sedangkan nilai energi total (ΔG^0) dari METTL10-GAA-SAM adalah -164,8143 kcal/mol dan METTL10-SAH-Kreatin sebesar -169,729 kcal/mol.

kcal/mol, sehingga didapatkan ΔG_{reaksi} sebesar -4,9247 kcal/mol. Nilai ΔG^0 yang didapatkan bernilai lebih kecil dari nol atau negatif, sehingga reaksi dapat terbentuk atau reaksi berjalan spontan. Reaksi yang terjadi adalah sebagai berikut:



Gambar 4.9 Reaksi pembentukan Kreatin oleh GAMT/METTTL-10

Berdasarkan nilai ΔG_{reaksi} pembentukan Kreatin oleh GAMT dan METTL-10, dapat dihitung nilai RMSD-nya (*root mean square deviation*). Menurut Reva, dkk. (2008)[39], nilai RMSD digunakan untuk menunjukkan besarnya nilai penyimpangan kedua molekul sehingga dapat menunjukkan kemiripan antara dua (2) struktur protein. Semakin kecil nilai RMSD dari struktur keduanya, maka struktur kedua molekulnya akan semakin mirip. Suatu penelitian dikatakan berhasil apabila homolog protein tersebut mendekati $\text{RMSD} < 2 \text{ \AA}$. Setelah dilakukan perhitungan, besarnya nilai RMSD dari ΔG_{reaksi} yang didapatkan adalah $0,08 \text{ \AA}$ sehingga kemungkinan METTL-10 memiliki kemiripan sifat dengan GAMT untuk menghasilkan Kreatin. Perhitungan terlampir.